

Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 3: Residu golongan sulfonamida dalam daging, telur, susu, dan olahannya



Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	1
4 Bahan	2
5 Peralatan	2
6 Cara uji	2
7 Interpretasi hasil	5
Lampiran A (informatif) Ketentuan tambahan.....	6
Bibliografi.....	7

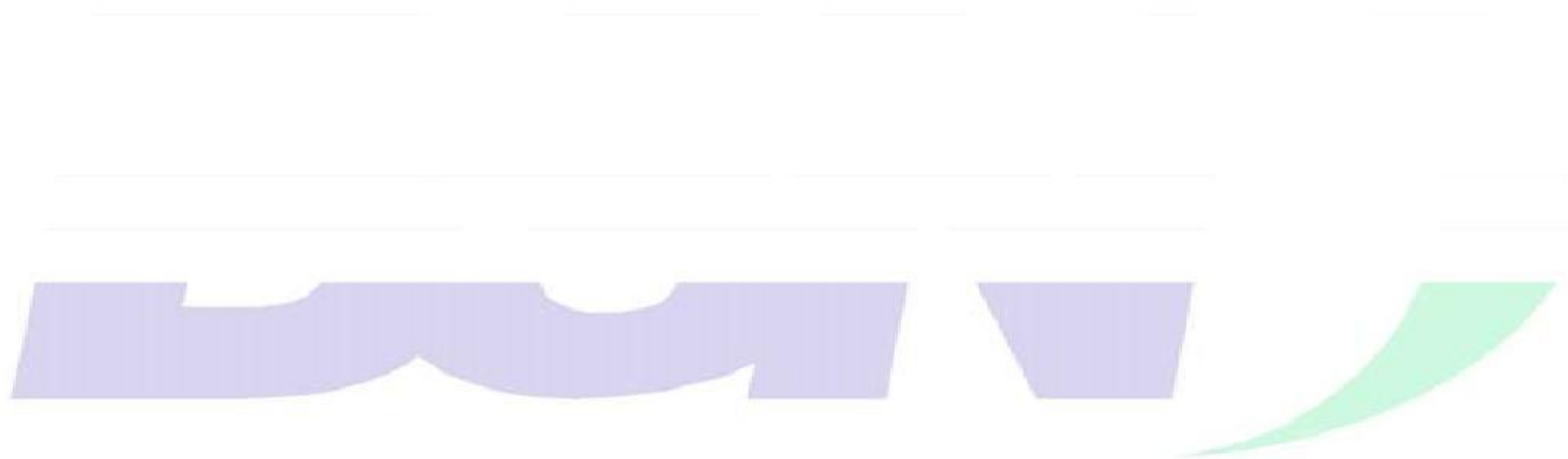


Prakata

Standar Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 3: Residu golongan sulfonamida dalam daging, telur, susu, dan olahannya disusun dan dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-03-S3 Metode pengujian peternakan. Standar ini disusun dengan maksud untuk standardisasi metode pengujian residu sulfonamida dalam daging, telur, susu, dan olahannya secara kualitatif dan kuantitatif serta mendukung perundangan-undangan negara Republik Indonesia yang berlaku di bidang keamanan pangan asal hewan.

Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus Subpanitia Teknis (SPT) 67-03-S3 Metode pengujian peternakan pada tanggal 14 Oktober 2008 di Jakarta yang dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis dan pihak terkait lainnya.

Standar ini juga telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 10 Februari 2009 sampai dengan 10 April 2009, dengan hasil akhir RASNI.



Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 3: Residu golongan sulfonamida dalam daging, telur, susu, dan olahannya

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode uji residu golongan sulfonamida dalam daging, telur, susu, dan olahannya secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

2 Istilah dan definisi

2.1

daging

bagian otot skeletal dari karkas ternak/hewan yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia, dapat berupa daging segar, daging segar dingin, atau daging beku

2.2

daging olahan

daging yang telah mengalami proses pengolahan

2.3

residu golongan sulfonamida

golongan sulfonamida yang terkandung dalam daging, telur, dan susu, baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung dari penggunaan golongan sulfonamida

2.4

susu

cairan yang berasal dari ambing ternak perah sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar sesuai ketentuan yang berlaku, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan

2.5

susu olahan

susu yang telah mengalami proses pengolahan

2.6

telur

telur yang dihasilkan oleh unggas yang belum mengalami proses pengolahan dan pengeraman untuk dikonsumsi manusia

2.7

telur olahan

telur yang telah mengalami proses pengolahan

3 Prinsip

Residu golongan sulfonamida dipisahkan dari matrik contoh, dimurnikan, kemudian diidentifikasi dan dikuantifikasi pada KCKT dengan kolom fase terbalik menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 267 nm.

4 Bahan

4.1 Standar pembanding

- a) sulfamerazin (SMZ),
- b) sulfadiazine (SD),
- c) sulfadimidin (SDM),
- d) sulfamonometoksin (SMT),
- e) sulfadimetoksin (SDMT),
- f) sulfaquinoksalin (SQ).

4.2 Bahan kimia dan penunjang

- a) n-heksana p.a,
- b) metanol p.a,
- c) metanol KCKT *grade*,
- d) asam asetat (CH_3COOH),
- e) asetonitril p.a,
- f) asetonitril KCKT *grade*,
- g) alumina aktif basa 1,
- h) *glass wool*,
- i) *aquabidest*,
- j) filter *polytetrafluoroethylene* (PTFE) (0,45 μm , 47 mm),
- k) filter (0,45 μm , 13 mm)

5 Peralatan

- a) neraca analitik,
- b) gelas ukur (10 ml, 100 ml, 500 ml),
- c) labu *Erlenmeyer* (250 ml, 500 ml),
- d) labu ukur (10 ml, 100 ml),
- e) corong pisah (250 ml),
- f) pipet volumetrik (1 ml, 2 ml, 4 ml, 10 ml),
- g) mikro pipet (50 μl sampai dengan 200 μl , 100 μl sampai dengan 1000 μl),
- h) *refrigerator*,
- i) penangas air,
- j) *vortex mixer*
- k) sentrifus,
- l) unit penyaring vakum ,
- m) alat penguap (*vacuum rotary evaporator* atau *nitrogen evaporator*),
- n) *ultrasonic bath*,
- o) gelas kolom,
- p) labu *evaporator* (50 ml) atau tabung reaksi (10 ml)
- q) *homogenizer ultraturax* atau *food processor*,
- r) satu unit KCKT dilengkapi dengan detektor UV
- s) kolom KCKT fase terbalik C-18,
- t) tabung reaksi bertutup (50 ml).

6 Cara uji

Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif (10 g atau 10 ml contoh yang ditambah larutan standar pembanding dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 150 μl , sehingga dihasilkan konsentrasi akhir 0,15 $\mu\text{g/g}$ atau 0,15 $\mu\text{g/ml}$).

6.1 Pembuatan pelarut/pereaksi

6.1.1 Larutan heksana jenuh dengan asetonitril

Campur 100 ml heksana p.a dengan 50 ml asetonitril p.a dalam corong pisah, kocok perlahan-lahan sambil sesekali kran dibuka untuk membuang gas yang terbentuk, diamkan hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah jelas. Yang dipergunakan adalah lapisan heksana (lapisan bagian atas).

6.1.2 Larutan metanol 85 %

Ukur 85 ml metanol p.a., kemudian tambahkan *aquabidest*, dan tepatkan sampai volume 100 ml.

6.1.3 Larutan fase gerak

Campurkan *aquabidest*, asam asetat, dan asetonitril dengan perbandingan 78 : 0,5 : 22, kemudian saring menggunakan filter PTFE, lakukan sonifikasi dengan menggunakan *ultrasonic bath* untuk menghilangkan gas dan udara (*degassing*).

6.1.4 Larutan standar campuran sulfonamida (sulfamerazine, sulfadiazine, sulfadimidin, sulfamonometoksin, sulfadimetoksin dan sulfaquinoksalin)

6.1.4.1 Larutan stok standar sulfonamida dengan konsentrasi 1000 µg/ml

Timbang masing-masing 10 mg standar pembanding sulfonamida (SMZ, SD, SDM, SMT, SDMT, SQ), kemudian masing-masing dilarutkan dengan metanol KCKT *grade* dalam labu ukur serta tepatkan masing-masing sampai 10 ml.

6.1.4.2 Larutan standar kerja

Pipet sebanyak 100 µl untuk masing-masing standar sulfonamida dari masing - masing larutan 6.1.4.1 ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian tambahkan larutan 6.1.3, dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/ml dari masing-masing sulfonamida.

6.1.4.3 Larutan untuk kurva standar

- Pipet 1 ml masing-masing larutan 6.1.4.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.3 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1 µg/ml untuk masing-masing larutan sulfonamida.
- Pipet 500 µl larutan 6.1.4.3 a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.3 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,05 µg/ml untuk masing-masing larutan sulfonamida.
- Pipet 1 ml larutan 6.1.4.3 a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.3 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 µg/ml untuk masing-masing larutan sulfonamida.
- Pipet 2 ml larutan 6.1.4.3 a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.3 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 µg/ml untuk masing-masing larutan sulfonamida.
- Pipet 400 µl larutan 6.1.4.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.3 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 µg/ml untuk masing-masing larutan sulfonamida.
- Pipet 800 µl larutan 6.1.4.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.3 dan tepatkan

SNI 7541.3:2009

sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,8 µg/ml untuk masing-masing larutan sulfonamida.

6.1.5 Prosedur ekstraksi contoh

- Timbang 10 g contoh padat/semi padat yang telah dihomogenkan dengan *homogenizer ultraturax* atau *food processor*, untuk contoh cair kocok dahulu kemudian pipet 10 ml, masukkan ke dalam tabung reaksi bertutup 50 ml.
- Tambahkan 25 ml asetonitril p.a dan kocok dengan *vortex mixer*.
- Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Pisahkan supernatan dari endapan.
- Tambahkan 25 ml lagi kedalam endapan 6.1.5 c, kocok dengan *vortex mixer*.
- Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Pisahkan supernatan dari endapan dan gabungkan supernatan ini dengan supernatan 6.1.5 c, kemudian pindahkan kedalam corong pisah.
- Tambahkan heksana yang telah dijenuhkan dengan asetonitril larutan 6.1.1 pada 6.1.5.e, kemudian kocok dan buang lapisan heksana.
- Ulangi 6.1.5. e
- Uapkan lapisan asetonitril dengan rotavapor atau dengan nitrogen evaporator hingga hampir kering.
- Larutkan ekstrak yang diperoleh dari 6.1.5. h dengan 4 ml metanol 85 %.

6.1.6 Pemurnian

6.1.6.1 Penyiapan/aktivasi kolom alumina aktif basa 1

- Masukkan 6 g sampai dengan 10 g serbuk alumina aktif basa 1 ke dalam kolom yang ujungnya telah diberi *glass wool*.
- Alirkan 10 ml metanol p.a ke dalam kolom 6.1.6.1.a secara perlahan-lahan, dan hindarkan terjadinya pembentukan gelembung udara di dalam kolom.

6.1.6.2 Proses pemurnian

- Alirkan contoh ke dalam kolom 6.1.6.1.b
- Bilas kolom dengan 10 ml larutan 6.1.2 secara perlahan-lahan dan biarkan terbang.
- Elusi kolom dengan mengalirkan 10 ml larutan 6.1.3, dan tampung *eluat* dalam labu *evaporator* (50 ml) /tabung reaksi (10 ml).
- Keringkan dengan alat penguap (*vacuum rotary evaporator*) atau nitrogen evaporator, hingga hampir kering.
- Larutkan kembali ekstrak 6.1.6.2.d hingga 200 µl dengan larutan 6.1.3, kemudian saring dengan filter (0,45 µm, 13 mm). Larutan siap diinjeksikan ke KCKT.

6.2 Penetapan dengan KCKT

6.2.1 Kondisi KCKT

- kolom : fase terbalik C-18
- detektor : UV, panjang gelombang 267 nm.
- fase gerak : larutan 6.1.3
- kecepatan alir : 1 ml/menit

6.2.2 KCKT

- Injeksikan larutan 6.1.4.3 secara berurutan ke KCKT dengan kondisi 6.2.1 hingga diperoleh kurva linier ($y = a + bx$).

- b) Injeksikan contoh 6.1.6.2.e.
- c) Lakukan pengamatan terhadap kurva pada kromatogram. Adanya kurva dengan waktu tambat yang sama dengan waktu tambat standar menunjukkan adanya residu golongan sulfonamida pada contoh
- d) Apabila area yang dihasilkan dari contoh 6.2.2.b melebihi area kurva kalibrasi 6.2.2.a, maka ekstrak 6.1.6.2.e dapat diencerkan sampai diperoleh area dalam rentang kurva kalibrasi.

7 Interpretasi hasil

Kadar residu golongan sulfonamida dihitung menggunakan persamaan garis :

$$y = a + bx,$$

Keterangan :

y : area contoh
a : *intercep*
b : *slope*

$$\text{Kadar residu } \mu\text{g/g atau } \mu\text{g/ml} = \frac{X \times V_s}{B}$$

Keterangan :

X : Konsentrasi residu dalam contoh hasil integrasi kurva ($\mu\text{g/g}$ atau $\mu\text{g/ml}$)
Vs : Volume akhir sebelum injeksi (ml)
B : Berat contoh (g) atau volume contoh (ml)

Lampiran A
(informatif)
Ketentuan tambahan

1. Setiap laboratorium yang akan menggunakan metode ini harus melakukan uji akurasi (ketepatan), presisi (ketelitian), limit deteksi (batas deteksi), dan limit kuantifikasi (batas penetapan).
2. Setiap akan melakukan pengujian gunakan selalu larutan standar kerja yang baru dibuat, sedangkan larutan stok standar dapat disimpan sampai dengan 1 bulan pada temperatur -18°C .

Bibliografi

Horwitz, W and G. W. Latimer (2005) Drugs and Feed Additive in Animal Tissues *in* Official Methods of Analysis of AOAC International, Edisi 18, chapter. 23

Horii, S.;C. Momma: K. Miyahara,; T. Maruyama,; M. Matsumoto (1990). Liquid Chromatographic Determination of Three Sulfonamides in Animal Tissue and Egg : 990-993.













BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id